

Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Emérito Dr. Rodolfo R. Brenner

Actividad antiproliferativa y anticolesterogénica de estatinas y monoterpenos*

Antiproliferative and anticholesterologenic activity of statins and monoterpenes

Atividade antiproliferativa e anticolesterogênica de estatinas e monoterpenos

► Mónica Polo^{1a}, Rosana Crespo^{2a}, Marianela Galle^{3a}, Boris Rodenak Kladniev^{4a}, Sandra Montero Villegas^{5b}, Margarita García de Bravo^{6a}

¹ Dra. de la Facultad de Ciencias Exactas.

² Dra. en Ciencias Naturales.

³ Bioquímica.

⁴ Licenciado en Biotecnología y Biología Molecular.

⁵ Médica.

⁶ Dra. en Ciencias Bioquímicas.

^a Universidad Nacional de La Plata.

^b Universidad de Costa Rica.

* Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP). UNLP-CONICET CCT La Plata. Facultad de Ciencias Médicas Calle 60 y 120. 1900 La Plata. Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Las estatinas son inhibidores competitivos de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa ampliamente usados en los tratamientos contra las hipercolesterolemias. Los monoterpenos son componentes no nutritivos de la dieta presentes en aceites esenciales de varias plantas que han demostrado tener múltiples efectos en la vía del mevalonato. Se estudia el efecto y mecanismo de acción de monoterpenos presentes en aceites esenciales, así como la combinación de éstos entre sí y con simvastatina sobre la síntesis de colesterol, el metabolismo lipídico y la proliferación celular *in vitro* en células hepáticas Hep G2 y no hepáticas A549, e *in vivo* en ratones atímicos huéspedes y no huéspedes de tumores derivado de células A549 implantados en ellos. Se abre así una gran expectativa sobre la potencialidad de la administración conjunta de distintos monoterpenos y de extractos naturales de aceites esenciales en el mejoramiento de las terapias antihipercolesterolemiantes y/o el tratamiento del cáncer, como así también en el potencial sinergismo con estatinas como una alternativa para disminuir las dosis efectivas y los efectos indeseados y/o tóxicos.

Palabras clave: vía del mevalonato * estatinas * monoterpenos * proliferación celular * colesterogénesis * células hep G2 * células A549 * ratones atímicos

Summary

Statins are competitive inhibitors of HMG-CoA reductase used in hypercholesterolemic patients. Monoterpenes are non-nutritive dietary components

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

found in the essential oils of many plants with pharmacologic effects on mevalonate metabolism. The study is centered on the effects and action mechanisms of the monoterpene components of essential oils and the combination of monoterpenes between them and combined with simvastatin on cholesterologenesis, lipid metabolism and cellular proliferation in vitro using two established cell lines, Hep G2 (derived from a human hepatoblastoma), A549 (derived from a human lung adenocarcinoma) and in vivo in no host and host nude mice carrying implanted tumors derived from A549. This opens up great expectations about the potential of co-administration of different natural isoprenoids and essential oils in improving anti-cholesterolemic therapies and/or cancer treatment as well as in the potential synergism with statins as an alternative to lower effective doses, decreasing the likelihood of undesired and/or toxic effects.

Key words: *mevalonte pathway * statins * monoterpenes * cellular proliferation * cholesterologenesis * hep G2 cells * A549 cells * athymic mice*

Resumo

As estatinas são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril – coenzima A (HMG-CoA) reductase amplamente utilizados nos tratamentos contra as hipercolesterolemias. Os monoterpenos são componentes não nutritivos da dieta encontrados em óleos essenciais de várias plantas que demonstraram ter múltiplos efeitos na via do mevalonato. Estudamos o efeito e o mecanismo de ação de monoterpenos encontrados em óleos essenciais, bem como a combinação deles entre si e com sinvastatina sobre a síntese de colesterol, o metabolismo lipídico e a proliferação celular in vitro em células hepáticas Hep G2 e não hepáticas A549 e in vivo em camundongos atímicos hospedeiros ou não hospedeiros de tumores derivados de células A549 implantadas neles. Isto abre grandes expectativas sobre o potencial da co-administração de diferentes monoterpenos e de extratos naturais de óleos essenciais na melhoria das terapias anti-hipercolesterolemiantes e/ou tratamento do câncer, assim como no potencial sinergismo com estatinas como uma alternativa para reduzir as doses efetivas e os efeitos indesejáveis e/ou tóxicos.

Palavras-chave: *via do mevalonato * estatinas * monoterpenos * proliferação celular * colesterogênese * células hep G2 * células A549 * camundongos atímicos*

Vía del mevalonato

La vía del mevalonato produce isoprenoides que son finalmente incorporados en diversos productos finales (esteroles y no esteroles) como colesterol, dolicol, ubiquinona, isopenteniladenina, geranilgeranilpírofosfato (GGPP) y farnesilpírofosfato (FPP) (1). El colesterol es un componente esencial de la membrana celular y precursor para la síntesis de hormonas esteroideas y ácidos biliares (2). El dolicol es una molécula portadora de oligosacáridos en la N-glicosilación de proteínas vinculadas a la producción de glicoproteínas. La ubiquinona está involucrada en la respiración mitocondrial y puede desempeñar un papel importante en la inhibición de la peroxidación lipídica (3). La isopenteniladenina es el sustrato esencial para la modificación de algunos ARNt. Geranilgeranil transferasa y farnesil transferasa utilizan GGPP y FPP, respectivamente, para las modificaciones postraduccionales de ciertas proteínas de la superfamilia Ras, GTPasas pequeñas que regulan importantes procesos celulares, como proliferación celular, diferenciación, apoptosis y organización del citoesqueleto (4).

La vía del mevalonato está presente en células de todos los tejidos estudiados y es particularmente activa en el hígado, órgano que cumple un rol central en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol corporal. La

etapa limitante de la velocidad de la vía es la conversión de 3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A (HMG CoA) en mevalonato, que es catalizada por la HMG CoA reductasa (HMGCR). Esta enzima se encuentra regulada a nivel transcripcional, traduccional y postraducciona a través del propio colesterol y de algunos intermediarios de la vía (1).

Ensayos *in vivo* han demostrado un incremento de la actividad de HMGCR en hígado de ratones NIH *nude* portadores de un carcinoma mucoepidermoide de pulmón humano (HLMC) en respuesta a la disminución de la colesterolemia ocasionada por la elevada demanda de colesterol del tejido tumoral (5) (Tabla I) y una correlación positiva entre la actividad de reductasa hepática y la severidad de la patología tumoral mamaria en ratas seniles (6).

En la mayoría de las células tumorales la regulación negativa ejercida por el colesterol e intermediarios de la vía sobre la HMGCR está ausente o deteriorada, lo cual resulta en una generación descontrolada de productos (7). No obstante, los estudios realizados en células de la línea Hep G2 (derivadas de un hepatoblastoma humano) han demostrado que la presencia de suero fetal en el medio de cultivo inhibe la actividad de la HMGCR (V_{max} en pmoles mevalonato/min/mg de proteína celular: 314,01 sin suero *vs* 113,20 con suero)

Tabla I. Actividad HMGCR hepática^a y colesterolemia^b de ratones nude no portadores y portadores del HLHC sacrificados a la medianoche.

	No Portadores	Portadores
Actividad HMGCR hepática (<i>pmol mevalonato min⁻¹ mg proteína⁻¹</i>)	462 ± 141	777 ± 78**
Colesterolemia (<i>mg dL⁻¹</i>)	92,22 ± 15,25	68,96 ± 12,38*

^a La actividad de HMGCR se determinó cuantificando la conversión de ¹⁴C-HMG CoA en ¹⁴C-mevalonato utilizando microsomas hepáticos aislados como fuente de enzima. Los valores son medias ± DE de diez muestras individuales, cada una analizada por duplicado.

^b La colesterolemia se determinó en plasma utilizando un *kit* enzimático. Los valores son medias ± DE de cinco muestras individuales, cada una analizada por duplicado.

Las medias dentro de un tejido común son diferentes: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

sin modificar los valores de K_M ($1,88 \times 10^{-5}M$ sin suero vs $1,99 \times 10^{-5}M$ con suero) y que la adición de mevalonato a un medio con suero inhibe aún más a la actividad reductasa (Tabla II). Estos resultados permiten sugerir que, al igual que en diversas células normales en cultivo, en Hep G2 el control por esteroides y no-esteroides derivados de la vía del mevalonato está conservado de modo que estas células pueden considerarse un modelo útil y fidedigno para el estudio de esta vía en células hepáticas (8).

Estatinas

Las estatinas son inhibidores competitivos de la HMGCR que afectan la colesterologénesis en una etapa temprana de la vía del mevalonato (9). Estos compuestos se utilizan con éxito en el tratamiento de la hipercolesterolemia en humanos, ya que ocasionan una disminución del contenido de colesterol celular que se traduce vía proteínas de unión al elemento regulador de esteroides 2 (SREBP-2) en un incremento del número de receptores para lipoproteínas plasmáticas de baja densidad (LDL) con el concomitante aumento de la captación de LDL-colesterol del plasma (1) (10).

La dosis terapéutica de estatinas para el tratamiento de la hipercolesterolemia es 1 mg/kg/día la cual conduce a niveles séricos de $0,1 \mu M$ (11). Si bien las dosis utilizadas son bien toleradas, pueden presentarse efectos secundarios adversos, los cuales incluyen hepatotoxicidad y miotoxicidad, pudiendo llegar en raros casos a la rabdomiólisis. La aparición de estos efectos secundarios aumenta por factores predisponentes (edad, sexo, tamaño corporal), con el incremento de las concentraciones plasmáticas de estatina, y con el uso concomitante de diversas drogas como inhibidores de citocromo P450 y otros fármacos reductores de lípidos (12) (13).

Ensayos realizados en ratones nude demostraron que dosis diarias de 50 mg/kg de simvastatina (una de las estatinas más utilizadas en el tratamiento de hipercolesterolemias en humanos) administradas a través del agua de bebida disminuyen el contenido de colesterol en hígado, incrementan 4,4 veces la HMGCR hepática y no modifican el colesterol plasmático (Tabla III). El hecho que las estatinas no posean actividad hipocolesterolemizante en roedores es atribuido a una capacidad limitada de catabolizar lipoproteínas plasmáticas a nivel hepático (14) y a una pronunciada inducción de la síntesis de HMGCR estimulada por SREBP-2.

Tabla II. Efecto de la adición de suero y/o mevalonato al medio de cultivo sobre la actividad HMGCR en células Hep G2.

Tratamiento		Actividad HMGCR (<i>pmol mevalonato/min/ mg prot. cel.</i>)
Sin suero		
	Control	274,51 ± 51,20
	Mevalonato	105,43 ± 22,18 *
Con suero		
	Control	111,82 ± 9,93
	Mevalonato	36,13 ± 5,70 *

Células Hep G2 en fase logarítmica de crecimiento fueron incubadas durante las últimas 24 horas en medios con o sin suero fetal y en presencia o ausencia de mevalonato. La actividad de HMGCR se determinó cuantificando la conversión de ¹⁴C-HMG CoA en ¹⁴C-mevalonato utilizando suspensión de células homogeneizadas por sonicación como fuente de enzima. Los valores son medias ± DE de cuatro muestras individuales, cada una analizada por duplicado.

Significativamente diferente respecto al control correspondiente: * $p < 0,001$.

Tabla III. Actividad HMGCR hepática^a, contenido de colesterol hepático^b y colesterolemia^c de ratones nude tratados durante 30 días con simvastatina (50 mg/kg/día) y sacrificados a la medianoche..

	Control	Simvastatina
Actividad HMGCR hepática (pmol/min/ mg prot)	403,6 ± 55,1	1726,2 ± 388,5 *
Colesterol hepático (mg/g de tejido)	2,6 ± 0,2	1,9 ± 0,4 *
Colesterolemia (mg/dL)	92,2 ± 15,3	72,1 ± 16,2

^a La actividad de HMGCR está expresada en picomoles de ¹⁴C-mevalonato formado por minuto por miligramo de proteína microsomal. Como fuente se utilizó se utilizaron microsomas lavados con buffer conteniendo Brij 96 para eliminar la simvastatina.

^b La cuantificación del contenido de colesterol hepático se realizó por GLC con un estándar interno de β-sitosterol.

^c La colesterolemia se determinó en plasma utilizando un *kit* enzimático.

Los valores son medias ± DE de cinco muestras individuales, cada una analizada por duplicado.

Las medias dentro de un tejido común son diferentes: * $p < 0,05$.

Para evaluar *in vitro* el efecto de la simvastatina en la biosíntesis de lípidos insaponificables, se realizaron estudios en células Hep G2 empleando ¹⁴C-acetato. Se demostró que la concentración mínima requerida para inhibir la incorporación de acetato en lípidos insaponificables es de 0,025 μM y que una concentración 1 μM inhibe un 41% la colesterogénesis (15).

Otro efecto descrito de las estatinas sobre el metabolismo lipídico es su influencia sobre los niveles de triglicéridos (TG) y ácidos grasos no esterificados (NEFA) plasmáticos por mecanismos no bien elucidados (16) (17) desconociéndose si controlan de alguna manera la incorporación y el destino intracelular de los lípidos. Bellini *et al* describieron por primera vez el efecto de una estatina sobre el metabolismo lipídico en una célula del epitelio pulmonar (células A549). Esta droga aumenta la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados (Figura

1) e incrementa un 30% la actividad de la Δ5 desaturasa medida por conversión de ácido eicosatrienoico (n-6) en ácido araquidónico (% de conversión 58,1 *vs* 75,7) (18).

Además de los efectos sobre la colesterogénesis, y dado que la inhibición de la vía del mevalonato por las estatinas se da en una etapa temprana de la misma, estas drogas afectan también la generación de los otros productos finales estrechamente vinculados con el crecimiento y la proliferación celular (19).

Diversos estudios demuestran que las estatinas poseen actividad antitumoral y sugieren un potencial rol para la prevención de cánceres humanos. Sus efectos antitumorales resultarían de la inhibición de la proliferación celular, la promoción de la apoptosis y la prevención de la metástasis y serían mediados fundamentalmente por la inhibición de la actividad de Ras y RhoA ocasionada por la falta de prenilación (20).

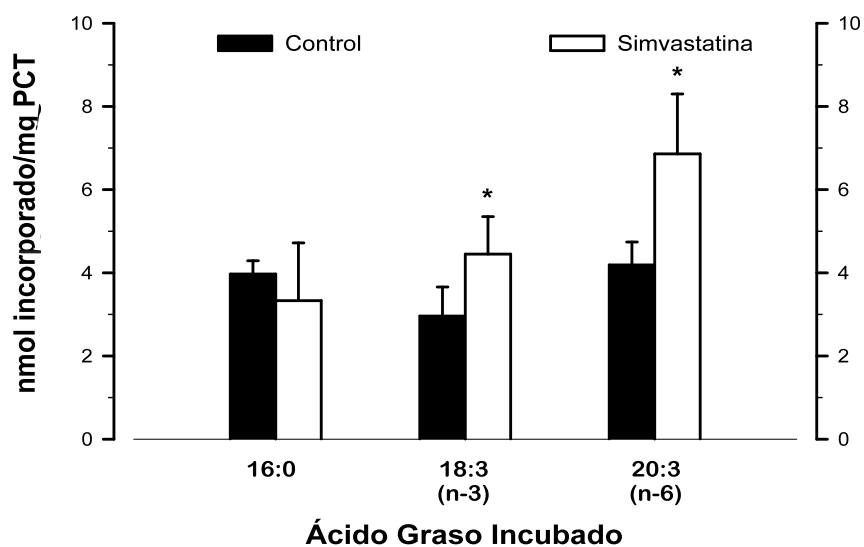


Figura 1. Incorporación de radiactividad en células A549 incubadas en presencia de varios [1-¹⁴C] ácidos grasos con y sin 90 mM simvastatina. Los valores representan las medias ± DE (n = 4), (*) $p < 0,05$. Todos los ácidos grasos fueron adicionados como sales sódicas unidos a albúmina delipidizada en concentración 0,66 mM por 24 h.

La inhibición de la proliferación celular por estatinas se ha descrito en diversas líneas celulares (20). El efecto antiproliferativo se logra a concentraciones efectivas para la inhibición de la prenilación de proteínas, las cuales son cientos de veces mayores a las requeridas para disminuir la síntesis de colesterol debido a la baja afinidad relativa de la escualeno sintasa por el FPP (21) (22).

Estudios en líneas tumorales humanas, en los cuales la viabilidad y proliferación fueron determinadas por conteo en hemocitómetro de células que excluyen el azul tripán y por medida de la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) a formazan por acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, demostraron que la simvastatina inhibe la proliferación de células Hep G2 y A549 a partir de concentraciones 10 μ M y 40 μ M, respectivamente (15) (23).

A diferencia de lo observado en cultivos celulares, los resultados respecto a la capacidad antitumoral de las estatinas *in vivo* son contradictorios y dependen de la dosis utilizada, la vía de administración y la velocidad de crecimiento del tumor. La administración a través del agua de bebida de 50 mg/kg de peso/día de simvastatina durante 33 días a ratones NIH *nude* portadores del carcinoma de pulmón humano HLMC no disminuye el crecimiento del tumor ocasionando una gran inducción de la HMGCR hepática y tumoral con un colesterolemia conservada (Tabla IV) (24).

En aquellos estudios donde se ha logrado disminuir el crecimiento tumoral la cantidad administrada por kg de peso fue al menos 50 veces superior a la dosis máxima recomendada en terapias hipocolesterolizantes en humanos, pudiendo resultar tóxicas para el huésped. También son contradictorios los resultados respecto a la asociación del uso de estatinas con el riesgo de contraer determinados tumores (25). Por lo tanto, la utilización de las estatinas como drogas antitumorales es muy discutida y la mayor parte de los resultados prometedores se han obtenido con la combinación de estatinas y agentes quimioterapéuticos (20) (26).

Monoterpenos

Los monoterpenos, como el geraniol, d-limoneno, perilalcohol y mentol son isoprenoides componentes no nutritivos de la dieta presentes en aceites esenciales de frutas cítricas, cereza, romero, albahaca, menta y otras hierbas aromáticas. Los isoprenoides (más de 22.000 compuestos) son derivados de la vía del mevalonato en plantas pero no son producidos por mamíferos y hongos (27). En la naturaleza están implicados en diversas interacciones entre las plantas, plantas con animales y/o plantas con microorganismos. Pueden funcionar como agentes de defensa, quimioatrayentes y repelentes de insectos. Funcionan también como hormonas, moléculas de señalización, de expresión de genes, en vías de transducción de señales, transportadores de electrones o dentro de la maquinaria fotosintética (28).

Se ha demostrado que algunos isoprenoides son capaces de disminuir el colesterol sérico (29) e inhibir el crecimiento de células tumorales tanto *in vitro* (30) (31) como *in vivo* (32-35), fenómeno que ha sido atribuido a los múltiples efectos farmacológicos de estos compuestos sobre la vía del mevalonato: inhibición la actividad HMG-CoA reductasa (36), inhibición de alguna enzima involucrada en la conversión de lanosterol en colesterol (30) (37) e inhibición de la isoprenilación de proteínas posiblemente a nivel de las enzimas prenil:proteína transferasas (38).

Estudios *in vitro*, realizados en células Hep G2 y A549, con geraniol, limoneno, linalool y cineol demuestran que todos ellos poseen actividad antiolesterolizante y antiproliferativa (15) (30) (39) (40) aunque las concentraciones efectivas varían según la línea celular y el monoterpeno utilizado (Tabla V).

Estudios realizados para analizar el efecto del geraniol, un monoterpeno dietario, sobre la vía del mevalonato y la proliferación en células Hep G2 demostraron que concentraciones superiores a 1 μ M inhiben la síntesis (15) y que concentraciones mayores a 100 μ M

Tabla IV. Actividad HMGCR hepática^a y colesterolemia^b de ratones *nude* portadores del HLMC tratados con 50 mg/kg/día de simvastatina durante 33 días y sacrificados a la medianoche.

	Control	Simvastatina
Actividad HMGCR hepática (pmol mevalonato/min/ mg prot)	555,2 \pm 36,9	1207,4 \pm 125,9 *
Actividad HMGCR tumoral (pmol mevalonato/min/ mg prot)	73,7 \pm 19,0	130,4 \pm 14,7 *
Colesterolemia (mg/dL)	69,0 \pm 12,4	63,6 \pm 8,8

^a La actividad de HMGCR está expresada en picomoles de ¹⁴C-mevalonato formado por minuto por miligramo de proteína microsomal. Como fuente se utilizó se utilizaron microsomas lavados con buffer conteniendo Brij 96 para eliminar la simvastatina.

^b La colesterolemia se determinó en plasma utilizando un *kit* enzimático.

Los valores son medias \pm DE de cinco muestras individuales, cada una analizada por duplicado.

Las medias dentro de un tejido común son diferentes: * $p < 0,05$.

Tabla V. Actividad antiproliferativa^a y anticolesterogénicas^b de monoterpenos naturales en células Hep G2 y A549.

	Antiproliferativo		Anticolesterogénico	
	IC50 p (μM)		IC50 sc (μM)	
	Hep G2	A549	Hep G2	A549
Geraniol	590	400	150	180
Limoneno	925	604	890	nd
Linalool	1550	1100	490	440
Cineol	6150	5010	560	350

Células Hep G2 y A549 en fase exponencial de crecimiento fueron tratadas con concentraciones crecientes de cada uno de los monoterpenos.

^a La proliferación celular fue determinada por el test de MTT. Se construyeron curvas dosis vs % de inhibición de proliferación y se calcularon las concentraciones que inhiben la proliferación un 50% (IC50 p).

^b La síntesis de colesterol fue cuantificada por incorporación de acetato. Se construyeron curvas dosis vs % de inhibición de síntesis de colesterol y se calcularon las concentraciones que inhiben colesterogénesis un 50% (IC50 sc).

Los valores son medias ± DE de cuatro muestras individuales.

inhiben la proliferación, la actividad HMGCR celular, la conversión de lanosterol en colesterol y la prenilación de proteínas, e incrementan la incorporación de colesterol desde el medio de manera dosis dependiente (30). La inhibición de la proliferación ocasionada por el geraniol 200 μM no es revertida por la adición de mevalonato exógeno, demostrando que la inhibición de la HMGCR no es responsable de la disminución del crecimiento a esa concentración (30).

En cuanto a los mecanismos de acción de monoterpenos sobre la HMGCR, Crespo *et al* demostraron que el geraniol ocasiona un incremento ARNm de SREBP-2 y HMGCR (Figura 2) conjuntamente con una disminución de la cantidad y actividad de HMGCR (Figura 3). De modo que este monoterpeno regula la actividad de la reductasa por un mecanismo postranscripcional

que podría estar mediado por el propio geraniol o por intermediarios de la vía del mevalonato acumulados como consecuencia del tratamiento (41) (42).

Estudios realizados *in vivo* demostraron la capacidad antilipogénica e hipolipemiante del geraniol en ratones *nude*. El tratamiento de los animales con dietas suplementadas con geraniol (50-75 mmol/kg de dieta) durante 21 días inhibe la HMGCR hepática a nivel postranscripcional –en concordancia con lo observado en células Hep G2– y la síntesis de colesterol y ácidos grasos a partir de acetato. También ocasiona un aumento del ARNm del receptor de LDL hepático y una disminución de la colesterolemia y la trigliceridemia (43).

Los estudios realizados en el modelo de células A549 implantadas en ratones atímicos demuestran la capacidad antitumoral del geraniol *in vivo*. El geraniol admi-

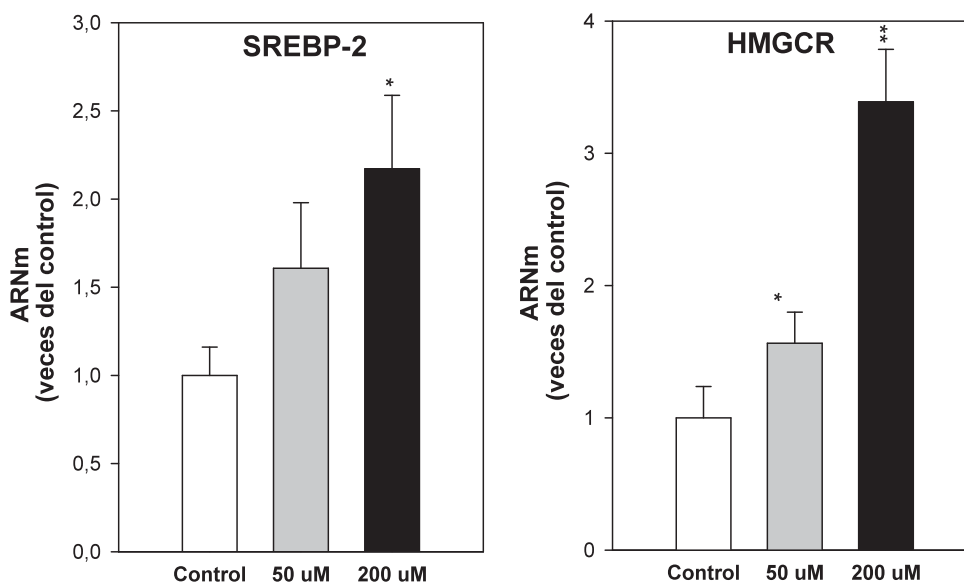


Figura 2. Cuantificación de ARNm de SREBP-2 y HMGCR en células Hep G2 tratadas con geraniol. Las células fueron cultivadas en botellas de 25 cm² y tratadas con geraniol (50 y 200 μM) en IMEM-Zo durante 24 h. La expresión del ARNm fue determinada por real-time RT-PCR. Los valores son medias ± DE de tres experimentos independientes, cada uno analizado por triplicado. (*) $p < 0,05$ vs. control, (**) $p < 0,01$ vs. Control.

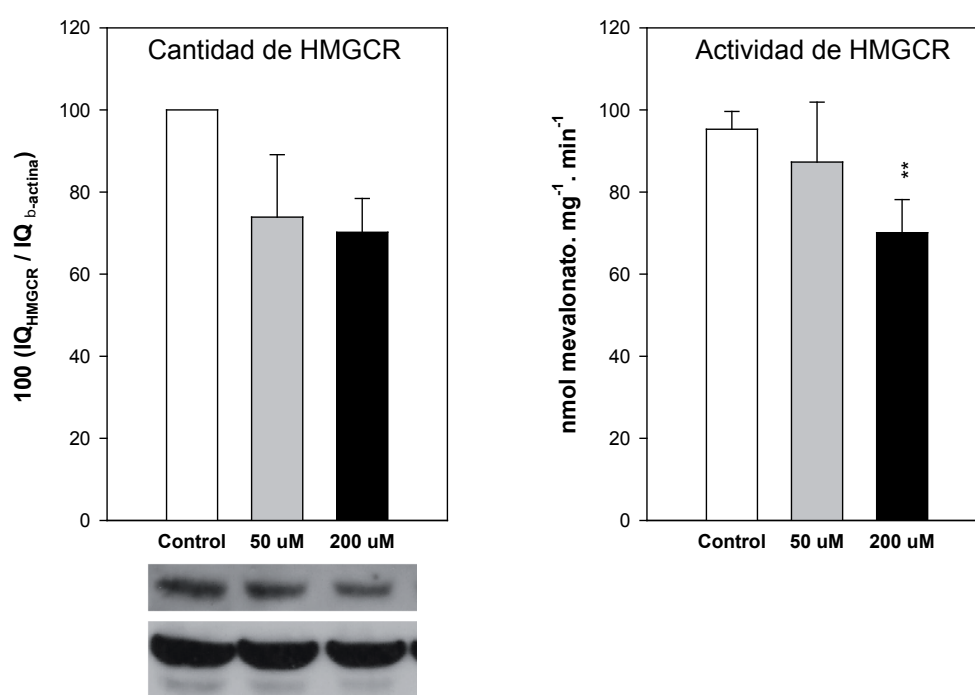


Figura 3. Efecto del geraniol sobre la cantidad^a y actividad^b de HMGCR en células Hep G2. Las células fueron cultivadas en botellas de 95 cm² y tratadas con geraniol (50 y 200 µM) en IMEM-Zo durante 24 h.

^a Las proteínas de lisados celulares fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida 12,5% (p/v) con dodecilsulfato de sodio (SDS) seguida de inmunotransferencia.

^b La actividad HMGCR fue determinada por radioensayo utilizando suspensión de células homogeneizadas por sonicación como fuente de enzima.

Los valores representan la media ± DE de tres experimentos independientes, cada uno analizado por triplicado. (*) $p < 0.05$ vs. control, (**) $p < 0.01$ vs. control.

nistrado como suplemento dietario (50-75 mmoles/kg dieta) reduce significativamente el crecimiento tumoral y aumenta la apoptosis (medida por actividad caspasa-3 y ensayo TUNEL) en las células tumorales (41). Estos resultados conjuntamente con las evidencias bien documentadas por 250 estudios epidemiológicos (44) de la relación inversa entre el riesgo de cáncer y el consumo de frutas y vegetales, presentan al geraniol como un compuesto natural con un gran potencial anticancerígeno.

Si bien los niveles de cada uno de los isoprenoides obtenidos a partir de la ingesta alimentaria probablemente no tienen suficiente impacto sobre la vía del mevalonato para ejercer un efecto contra el cáncer, la protección conferida por los productos derivados de las plantas puede ser atribuida a la acumulación de los efectos de los isoprenoides constituyentes sobre la actividad desregulada de la vía del mevalonato característica del tejido tumoral (45). Por este motivo, en los últimos años ha habido un interés considerable y creciente en el uso de aceites esenciales ricos en isoprenoides en el tratamiento de múltiples patologías como cáncer (44-46), diabetes (47) (48) o hipercolesterolemia (49).

Resultados alentadores de estudios realizados en células tumorales humanas Hep G2 y A549 demuestran

efectos sinérgicos al combinar monoterpenos puros (39) y alta eficacia antiproliferativa y anticolesterogénica de aceites esenciales ricos en múltiples isoprenoides (40) (50).

Combinación estatinas-monoterpenos

El hecho de que la inhibición de la HMG-CoA reductasa por los monoterpenos se produzca a través de un mecanismo diferente del empleado por las estatinas y que, además, afecten a la vía del mevalonato a otros niveles, abre una expectativa enorme respecto a la posibilidad de que el uso combinado de estatinas con monoterpenos naturales (suministrados como complemento o suplemento de la dieta) permita:

- disminuir la dosis efectiva de las estatinas en el tratamiento de hipercolesterolemias hasta valores en los cuales los efectos indeseables sean prácticamente nulos e
- incrementar la eficacia antitumoral de ambos compuestos

Al respecto, Polo *et al* demostraron efectos sinérgicos de la combinación de geraniol con simvastatina en células Hep G2, tanto en lo que respecta a la inhibición de la proliferación celular como en la inhibición de la colesterolénesis (15). Estos estudios también sugieren que la vía del mevalonato está potencialmente ligada a la regulación de la biosíntesis de fosfolípidos. Se están llevando a cabo experimentos *in vivo* a fin de estudiar el efecto del tratamiento combinado de geraniol con simvastatina en el crecimiento tumoral y la homeostasis del colesterol y analizar la potencial capacidad de los monoterpenos para evitar la inducción de la reductasa (hepática y tumoral) ocasionada por las estatinas. Se utilizan hembras (nu/nu) ya que también se demostró que los machos *nude* son hipocolesterolémicos e hipotriglicéridémicos, en comparación con las hembras (51) y/o ratones heterocigotas (+/nu).

Estos estudios contribuirán a un mejor conocimiento de la acción de isoprenoides naturales que interfieren en una vía metabólica tan compleja como la vía del mevalonato. El uso de combinaciones de estos compuestos o de aceites esenciales ricos en ellos, podría mejorar el uso de estatina en la lucha contra el cáncer y/o enfermedades cardiovasculares.

CORRESPONDENCIA

DRA. MARGARITA GARCÍA DE BRAVO
INIBIOLP. Facultad de Ciencias Médicas
Calle 60 y 120
1900 LA PLATA
mgarcia@med.unlp.edu.ar

Referencias bibliográficas

- Goldstein JL, Brown M S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature (Lond.)* 1990; 343: 425-30.
- Edwards PA, Ericsson J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 157-85.
- Stocker R, Bowry VW, Frei B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does α -tocopherol. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1646-50.
- Vojtek AB, Der CJ. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 1998; 273: 19925-8.
- Polo M, Bravo MG de, Carbone C. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in liver of athymic mice with or without an implanted human carcinoma. *Comp Biochem Phys Part B* 1999; 122: 433-7.
- Polo M, García-Bravo M, Igal IN, Tacconi-Gómez Dumm IN, Goya R. Age changes in the activity of liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in female rats: Influence of mammary pathology. *Mech Ageing Dev* 1998; 100: 41-51.
- Siperstein MD. Role of cholesterologenesis and isoprenoids synthesis in DNA replication and cell growth. *J Lipid Res* 1984; 25: 1462-8.
- Polo MP, Alaniz MJT de, Bravo MG de. Algunos aspectos de la regulación de la síntesis de mevalonato en células Hep G2 en cultivo. *FABICIB* 2002; 6: 9-17.
- Istvan FS, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 2001; 292: 1160-4.
- Brown MS, Goldstein J L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:11041-8.
- Pan HY, DeVault AR, Wang-Iverson D, Ivashkiv E, Swanson BN, Sugerman AA. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of pravastatin and lovastatin. *J Clin Pharmacol* 1990; 30: 1128-35.
- Rosenson RS. Current overview of statin-induced myopathy. *Am J Med* 2004; 116: 408-16.
- Spalvieri MP, Oyola ME. Estatinas: incidencia de efectos adversos. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2011; 45 (4): 727-38.
- Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K. *Biochim Biophys Acta* 1979; 575: 266-76.
- Polo M, Crespo R, Bravo MG de. Geraniol and simvastatin show a synergistic effect on a human hepatocarcinoma cell line. *Cell Biochem Funct* 2011; 29: 452-8.
- Gaw A. HDL-C and triglyceride levels: relationship to coronary heart disease and treatment with statins. *Cardiovasc Drugs Ther* 2003; 17: 53-62.
- Roglans N, Sanguino E, Peris C, Alegret M, Vazquez M, Adzet T. Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor α expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 232-9.
- Bellini MJ, Polo MP, Alaniz MJT de, Bravo MG de. Effect of simvastatin on the uptake and metabolic conversion of palmitic, dihomo-gamma-linoleic and alpha-linolenic acids in A549 cells. *Prostagland., Leukotr & Ess Fatty Acids* 2003; 69: 351-7.
- Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 930-42.
- Sassano A, Plataniias LC. Statins in tumor suppression. *Cancer Lett* 2008; 260: 11-9.
- Moyad MA. Why a statin and/or another proven heart healthy agent should be utilized in the next major cancer chemoprevention trial: part I and II. *Urol Oncol* 2004; 22: 466-77.
- Martínez-Botas J, Ferruelo AJ, Suárez Y. Dose-dependent effects of lovastatin on cell cycle progression: distinct requirement of cholesterol and non-sterol mevalonate derivatives. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1532: 185-94.
- Polo M, Crespo R, Bravo MG de. Simvastatin and geraniol show a synergistic effect on A549 cells. *Biocell* 2007; 31: Supplement 126.

24. Polo M, Bravo MG de. Simvastatin effect on a human lung carcinoma and cholesterol homeostasis of host and non-host mice. *Arch Physiol Biochem* 2001; 109(5): 435-40.
25. Brown AJ. Cholesterol, statins and cancer. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 135-41.
26. Osmak M. Statins and cancer: Current and future prospects. *Cancer Lett* 2012; 324: 1-12.
27. McGarvey DJ., Croteau R. Terpenoid Metabolism. *Plant Cell* 1995; 7: 1015-26.
28. Holstein S, Hohl R. Isoprenoids: Remarkable diversity of form and function. *Lipids* 2004; 39: 293-309.
29. Yu SG, Abuirmeleh NM, Qureshi AA, Elson CE. Dietary β -ionone suppresses hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 1443-96.
30. Polo MP, Bravo MG de. Effect of geraniol on fatty acid and mevalonate metabolism in the human hepatoma cell line Hep G2. *Biochem Cell Biol* 2006; 84: 102-11.
31. Wiseman DA, Werner SR, Crowell PL. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21Cip1 and p27Kip1 in human pancreatic adenocarcinoma cells. *JPET* 2007; 320: 1163-70.
32. YuriIT, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Kiyozuka Y, Senzaki H, Shikata N, *et al.* Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 84: 251-60.
33. Burke YD, Ayoubi AS, Werner SR, McFarland BC, Heilman DK, Ruggeri BA, *et al.* Effects of the isoprenoids perillyl alcohol and farnesol on apoptosis biomarkers in pancreatic cancer chemoprevention. *Anticancer Res* 2002; 22: 3127-34.
34. Rao CV, Newmark HL, Reddy BS. Chemopreventive effect of farnesol and lanosterol on colon carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 2002; 26: 419-25.
35. Ong TP, Heidor R, de Conti A, Dagli ML, Moreno FS. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMG-CoA reductase. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1194-203.
36. Peffley DM, Gayen AK. Plant-derived monoterpenes suppress hamster kidney cel 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase synthesis at the post-transcriptional level. *J Nutr* 2003; 133: 38-44.
37. Ren Z, Gould MN. Inhibition of ubiquinone and cholesterol synthesis by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Lett* 1994; 76: 185-90.
38. Mo H, Elson CE. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229: 567-85.
39. Rodenak-Kladniew B, Manassero C, Polo M, García de Bravo MM. Synergistic effects of monoterpenes on Hep G2 and A549 tumor cells. *Biocell* 2010; 34 Supl: 92.
40. Manassero CA, Girotti JR, Mijailovsky S, García de Bravo M, Polo M. *In vitro* comparative analysis of antiproliferative activity of essential oil from mandarin peel and its principal component limonene. *Nat Prod Res* 2012 (en prensa).
41. Crespo R, Galle M, Bravo MG de, Polo MP. Geraniol inhibits tumor cell proliferation *in vitro* and *in vivo* by posttranscriptional regulation of HMGCR. *Biomedical Papers* 2012; 156 Supl 1, 595.
42. Crespo R, Montero Villegas S, Abba M, García de Bravo M, Polo M. Transcriptional and posttranscriptional inhibition of HMGCR and PC biosynthesis by geraniol in two Hep-G2 cell-proliferation-linked pathways. *Biochem Cell Biol* 2012 (En prensa).
43. Galle M, Crespo R, Soberon MV, Polo M, García de Bravo M. Geraniol as a nutrigenomic hypolipidemic agent". *Biocell* 2012; 36 Supl: 107.
44. Smith-Warner SA, Giovannucci E. Fruit and vegetable intake and cancer. En: Heber D, Blackburn G, editors. *Nutritional Oncology*, San Diego, CA: Academic Press, 1999. p. 153-83.
45. Tatman D, Mo H. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. *Cancer Letters* 2002; 175: 129-39.
46. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, Adami H.O, Beeson WL, van den Brandt PA, *et al.* Intake of fruits and vegetables and risk of breast cancer: a pooled analysis of cohort studies, *J Am Med Assoc* 2001; 285: 769-76.
47. Tavafi M, Ahmadvand H, Tamjidipoor A, Delfan B, Khalatbari AR. Satureja khazestanica essential oil ameliorates progression of diabetic nephropathy in uninephrectomized diabetic rats. *Tissue Cell* 2011; 43: 45-51.
48. Chung MJ, Cho SY, Bhuiyan MJ, Kim KH, Lee SJ. Anti-diabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose- and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice. *Br J Nutr* 2010; 104(2):180-8.
49. Suanarunsawat T, Devakul Na Ayutthaya W, Songsak T, Thirawarapan S, Pongshompoo S. Antioxidant activity and lipid-lowering effect of essential oils extracted from ocimum sanctum L. leaves in rats fed with a high cholesterol diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46(1): 52-9.
50. Montero Villegas S, Cicció Alberti JF, Castro A, Polo M, García de Bravo M. Differential modulation of the mevalonate pathway by diverse *Lippia alba* chemotypes. *Biocell* 2012; 36 Supl, 107.
51. Bravo MG de, Polo M, Reggiani P, Galassi P, Rimoldi O, Goya R. Metabolic alterations in congenitally athymic male mice: effects of neonatal thymulin gene therapy. *Biocell* 2007; 31 Supl: 126.

Aceptado para su publicación el 20 de diciembre de 2012